

日本医療研究開発機構 医療分野研究成果展開事業  
産学連携医療イノベーション創出プログラム 基本スキーム (ACT-M)  
事後評価報告書

公開

## I 基本情報

研究開発課題名： (日本語) IPF 急性増悪治療を目指した S100A8/A9 抗体の研究開発  
(英語) Research and Development of anti-S100A8/A9 monoclonal antibody for  
treatment of acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF)

研究開発実施期間：令和2年8月14日～令和5年3月31日

研究開発代表者 氏名：(日本語) 阪口 政清  
(英語) Masakiyo Sakaguchi

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：  
(日本語) 岡山大学学術研究院 医歯薬学域・細胞生物学分野・教授  
(英語) Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences・  
Department of Cell Biology・Professor

## II 研究開発の概要

### 研究開発の目的

S100A8/A9 タンパク質 (S100A8 と S100A9 のヘテロダイマー) は、主に好中球や単球など間質細胞に由来する炎症メディエーターである。代表者らは、S100A8/A9 のヘテロダイマー構造特異的に結合するモノクローナル抗体を炎症性疾患治療薬として開発した。開発製剤は、炎症環境において急激に濃度が高まる S100A8/A9 とその受容体 (RAGE, MCAM, ALCAM, EMMPRIN, NPTN- $\beta$ , TLR4) との結合を阻害し、広範囲な炎症性サイトカイン産生を抑制する。本研究では、未だ有効な治療法のない特発性肺線維症 (IPF) 疾患に対し、予備実験において高い有効性を示した抗 S100A8/A9 抗体に着目して、ヒト化抗 S100A8/A9 抗体の作製とその GMP 基準の製造方法を確立する。並行して、抗体製剤の薬効および作用メカニズムを *in vitro* 細胞モデル・*in vivo* ブレオマイシン誘発性 IPF マウスモデルにおいて詳細に検証する。IPF では、疾患進行の過程で予期せず惹起される急性増悪が最大の死亡原因である。そこで、抗 S100A8/A9 抗体が急性増悪を抑止する効力についても検証を進め、ヒト化抗 S100A8/A9 抗体を従来薬剤では治療困難である IPF 急性増悪等の重篤な炎症性疾患の治療手段として実用化することを目的とした。

### 研究開発の成果

本研究開発における岡山大学および研究分担機関であるノーベルファーマ株式会社の研究成果につ

いて以下に示す。

1. IPF ブレオマイシンマウスモデルにおける肺線維化の進行と S100A8/A9 濃度の相関性の確認

マウスへのブレオマイシン投与により上昇する NF $\kappa$ B 活性を経時的に EMSA assay で評価し、S100A8/A9 濃度の上昇との相関関係があることを確認した。さらに肺・血漿における S100A8/A9 濃度は、炎症状態と極めて高い相関性を示した。

2. IPF ブレオマイシンマウスモデルにおける S100A8/A9 抗体の治療効果の評価

ブレオマイシン投与数時間後に S100A8/A9 抗体を投与し、21 日目に① CT Scan により肺線維化状態、② qPCR により肺の炎症性サイトカインの発現変化、③ EMSA assay により肺組織における炎症シグナルの 3 つを評価した。その結果、S100A8/A9 抗体は有意に肺線維化・炎症性サイトカインの発現・肺炎症 (NF $\kappa$ B の活性化) を抑制した。

3. IPF 患者血漿および肺組織中の S100A8/A9 濃度の解析

IPF 患者の血漿および肺組織中の S100A8/A9 濃度と細胞内シグナルの解析を実施した。患者の血漿 S100A8/A9 濃度は健常人と比較して有意に高く、肺組織中の S100A8/A9 の発現は極めて高く、肺の炎症状態と相関していた。

4. IPF ブレオマイシンマウスモデルにおける治療的プロトコルでの S100A8/A9 抗体の治療効果の評価

IPF は、予後不良の疾患であり、慢性進行性の経過をたどり肺線維化が進行する。その間、急性増悪の発現頻度は徐々に上昇していく。そこでより臨床に即したプロトコルで治療効果を確認するため、肺線維化が確認されてから抗体治療を行うマウスモデルを構築し、S100A8/A9 抗体の治療効果の評価した。CT Scan の解析による肺線維化病変部面積の有意な低下から、S100A8/A9 抗体の治療効果を確認した。

5. リポポリサッカライド (LPS) 経気道投与による IPF 急性増悪の病態を模倣するマウスモデルの構築と S100A8/A9 抗体の治療効果の評価

ブレオマイシン誘発性 IPF モデルにおいて肺線維化所見を確認後、LPS を経気道投与し、IPF 急性増悪の病態を模倣するマウスモデルにおいて、S100A8/A9 抗体の治療効果の評価した。肺の状態を HE 染色および S100A9 の免疫組織染色、Masson's trichrome staining により確認した結果、S100A8/A9 抗体投与群において、炎症細胞の浸潤が少なく、肺線維化の進行も抑制されていることが確認された。総コラーゲン量を反映するマーカーとして用いられるヒドロキシプロリン量も S100A8/A9 抗体投与体群で有意に減少していることが確認された。

6. S100A8/A9 ヘテロダイマー構造の重要性の検証

生体内では S100A8 と S100A9 はそれぞれモノマーで存在しているよりも両者のヘテロダイマー体で存在している割合はるかに高いことが知られている。しかし、各モノマーでの細胞機能も報告されていることから、それぞれの線維芽細胞への作用の強さについて検討を加えた。NF $\kappa$ B の活性化を指標に EMSA アッセイにより検討したところ、S100A8 と S100A9 のモノマーに比較し、S100A8/A9 ヘテロダイマー体が強力に NF $\kappa$ B 活性を誘導することが判明した。さらに S100A8/A9 抗体は、各モノマー刺激による低い NF $\kappa$ B 活性は抑制せず、S100A8/A9 ヘテロダイマー体によってもたらされた NF $\kappa$ B 活性を効率よく抑制した。この結果により、S100A8/A9 ヘテロダイマー体を標的とする抗体治療の妥当性が示された。

7. ヒト化抗体の *in vitro* における肺線維化抑制効果の確認

ヒト肺線維芽細胞 (MRC5) を用いて、ヒト化抗体の中和活性をキメラ抗体およびマウス抗体と比較した。中和活性は、S100A8/A9 が誘導する NF $\kappa$ B の活性化・IPF のマーカー分子の発現上昇のヒト化抗体による抑制効果を指標に評価した。その結果、S100A8/A9 刺激や LPS 刺激した好中球との共培養で誘導される非常に高い NF $\kappa$ B 活性は、ヒト化抗 S100A8/A9 抗体の添加により特異的にほぼ完全に

抑制されることが EMSA アッセイにより、さらに Western Blotting 解析により、IPF のマーカー分子である I 型コラーゲン (COL1A1) および  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA: 活性化線維芽細胞(筋線維芽細胞)に強く発現する) の発現上昇が完全に抑制されることを確認した。また S100A8/A9 刺激で強く発現が上昇する  $\alpha$ -SMA のヒト化抗体による発現抑制効果を免疫細胞染色像においても確認した。すべての *in vitro* 実験において、ヒト化抗体の薬効は、キメラ抗体・マウス抗体と同等であった。 $\beta$ -actin の染色像からも少し形態の異なる線維芽細胞が確認され、S100A8/A9 は、線維芽細胞を活性化し筋線維芽細胞への分化を促進する可能性を示した。

これらのヒト化抗体の中和活性評価の結果から、ヒト化によるアミノ酸配列の置換を行っても抗体の治療効果は維持されていることを示した。

ノーベルファーマ株式会社は、本研究開発において、ヒト化抗体の作製に成功し、GMP 製造の基盤となる Parent Cell Bank (PCB) を確立した。令和 2 年度、岡山大学で作製されたキメラ抗 S100A8/A9 抗体のヒト化を進め、親和性を維持したヒト化抗 S100A8/A9 抗体を取得するに至った。キメラ抗体のヒト化による親和性の低下は観察されなかった。令和 3 年度、そのヒト化抗体の配列を基に、Parent Cell Bank (PCB) を作出するための発現ベクターと宿主細胞を決定し、安定株作製に使用する抗体遺伝子を宿主細胞での抗体産生が最大になるように最適化した。GMP 細胞系確立とつなげるため、まず発現ベクターを宿主細胞に組み込んだステーブルプールを作製し、クローナリティーを確認した後、シングルセルクローニングを行い、バッチ培養評価までの作業を、CDMO と協力し予定通り完了した。バッチ培養評価の結果から、上位 50 クローンでは 1200~1800 mg/L の生産性が示された。フェドバッチ培養により生産性は 2.5 倍前後に上昇するものと予想されるため、上位 50 クローンの生産性は、3000~4500 mg/L 程度と期待された。令和 4 年度、PCB 選定試験を行った。継代安定性試験により選定した 8 クローンにおいて、3 回のフェドバッチ培養を実施した。各クローン 3 回のフェドバッチ培養における抗体産生量、各培養における到達産生量を計測し、生細胞密度・生存率を確認し、上位 3 クローンを選択した。3 クローン (5D2、6C8、7B9) における産生量の平均値は 4.7 g/L、5.1 g/L、4.5 g/L を示した。これら 3 クローンを PCB 候補クローンとして選定し、各 100 本の凍結ストックを作製した。さらにクローン 5D2、6C8、7B9 についてリアルタイム PCR 法によるマイコプラズマ感染否定試験を実施した。3 クローンすべてにおいてマイコプラズマ DNA は未検出であったことから、マイコプラズマ陰性であると判定した。今後、バイオリアクターによる生産培養を検討することで、更なる生産性の向上が期待される結果が得られた。

本事業における開発目標はすべて達成し、この成果を基に非臨床 POC 取得を目指す。

### 研究開発の将来展望

IPF は世界的に発生する難治性疾患であり、ステロイドや免疫抑制剤は死亡率を改善せず、高率に肺がんを合併し、予後に影響する。特に IPF 急性増悪は、IPF 患者の死亡原因として最も多く、平均生存期間は 2 か月以内と極めて予後不良である。治療薬としては、ピルフェニドン・ニンテダニブの 2 種類の薬が認可され使用されているが、効果は限定的であり、十分には肺線維化の進行を抑制できず、根治療法は、肺移植しか存在しない。S100A8/A9 は、IPF の病態進行において、複数の作用点を持ち、急性増悪の危険性を高め、病態を進行させる。S100A8/A9 抗体は、病態進行の各段階で効果を発揮し、肺線維化を強力に抑制するものと考えられる。我々は、マウスモデルで肺線維化を誘発後の抗体治療においても十分に治療効果が得られることを示しており、既存治療とは異なる作用点をもつ治療薬として優位性は高い。本シーズは、最初の承認取得適応と考える IPF だけではなく、多種類の炎症性疾患治療薬として幅広く実用化することが可能である。将来的には各種炎症性疾患の治療薬として適応拡大を目指す。

## **Background and Aim**

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a severe lung fibrosis disease that has been increasing worldwide annually. Owing to the mechanistically complex nature of the disease, there is still no genuinely effective medicine to cure IPF, so the development of innovative drug(s) is an imperative subject. Faced with this problem, we had an idea that our developed innovative antibodies S100A8/A9 neutralizing antibody (Ab45) 【PCT/JP2019/16100】 may be helpful in this problematic IPF and its more severe type, acute exacerbation IPF, either, since S100A8/A9 is a vital inflammatory factor involved in both etiology and pathogenesis of several severe inflammatory diseases. The abnormally given-off S100A8/A9 at a much high level stimulates several cells, including fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells, and inflammatory cells through the bindable receptors (EMMPRIN, NPTN $\beta$ , MCAM, ALCAM) we newly identified besides canonical receptors TLR4 and RAGE, resulting in progression to an unstoppable inflammation via mal-cross-talking among the stimulated cells. The Ab45, therefore, may have great potential to prevent the passage of these diseases. This study aims to evaluate the therapeutic effect of Ab45 on the mouse model of IPF and an acute exacerbation of IPF.

## **Readout**

We have conducted the following subjects and got several essential readouts for our desired tasks. First, we established a humanized Ab45 antibody 【PCT/JP2020/039460】 production system based on CHO cells that matched with GMP grade in collaboration with Nobelpharma Co. Ltd. Second, we verified that S100A8/A9 was significantly upregulated in the lung tissues and serums in the IPF patients. Third, we found that S100A8/A9 promotes the growth and production of collagens in lung fibroblasts through one of the S100A8/A9 receptor RAGE, which requires NF $\kappa$ B activation in a sustained manner. We found that Ab45 effectively prevents the bleomycin-mediated IPF-like symptoms in a renowned mouse IPF model. Besides our note, Ab45 effectively inhibits the acute exacerbation IPF mouse model established by the combination with LPS in the bleomycin treatment. These results show an unusual potential of Ab45 to quench the difficult IPF and its aggravation.

## **Next Stage**

Based on our readouts as aforementioned, in this project, to define the list of safety validating tests in the non-clinical study, we are next aiming to reveal the therapeutic meaningful of Ab45 to IPF using several other IPF models which FDA recommended and study the S100A8/A9 levels in the BALFs from the IPF patients.

### III 事後評価総合所見

S100A8/A9 抗体を開発する本課題の目標はほぼ全て達成できた。これを標的とする妥当性を明らかにしたこと、また、GMP 製造の基盤となる GMP 細胞系を確立し、GMP での原体、製剤の製造に関しても実用化へのめどを立てたことなどは高く評価できる。

しかし、臨床開始に必要な薬事的各種非臨床試験は本課題終了後に実施予定のものが多く、臨床に向けた業務の全体像は明確になっていない。ヒト型抗体の親和性の高いカニクイザルでの安全性試験や、マウス以外の動物種における薬効薬理評価について検討していただきたい。

IPF 治療薬としては新規機序で独自性があり、本剤には一定の市場優位性も期待できる。今後も企業と連携して開発を継続することを期待する。